歯周病の診断に関する細菌学的研究

神 山 章

大阪大学歯学部口腔治療学講座

(指導: 岡田 宏教授)

(昭和63年12月26日受付)

Microbiological and Serological Investigation of
Periodontal Disease Activity

Akira KOHYAMA

Department of Periodontology and Endodontology, Osaka University Faculty of Dentistry

(Director: Prof. Hiroshi OKADA)

If disease activity in periodontal disease can be determined, the therapeutic measures of periodontitis may become diverse and different from patient to patient. The purpose of the present study was to evaluate the usefulness of microbiological and serological examination of periodontopathic bacteria in detecting destructive periodontal disease activity.

One hundred and forty-eight sites in 52 subjects with moderate to severe periodontitis were studied clinically. Clinical parameters included plaque index, gingival index, probing depth, bleeding on probing and percent bone loss as measured radiographically. Subgingival plaque of whole sites was investigated microbiologically by means of indirect fluorescent-antibody technique with rabbit antibodies against *Actinomyces viscosus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (2 serotypes), *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. The levels of serum IgG antibody to these organisms were determined by enzyme-linked immunosorbent assay with whole cell preparations. Thirty-two of 52 subjects were instructed in oral hygiene and received several sessions of scaling and root planing. The clinical, bacteriological and sero-

logical assessments were also performed after periodontal therapy. Active disease site was defined as the site of which clinical status did not be improved even after periodontal treatment.

B. gingivalis, *B. intermedius* and *A. viscosus* were detected in 80% of periodontal lesions, and the proportion of *B. gingivalis* was the highest among six bacterial species tested. *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* and *F. nucleatum* were found only occasionally and in low numbers. The proportion of *B. gingivalis* was higher in severely inflamed sites than in clinically healthy sites. *B. gingivalis* and *B. intermedius* are rarely found in treated periodontitis sites, while the proportion of *A. viscosus* was slightly increased after treatment.

Sera of the pre-treatment patients demonstrated significantly higher antibody levels to *B. gingivalis* and significantly lower levels to *A. viscosus* than those of healthy persons. Antibody levels reactive with other four species in the patients did not significantly differ from the levels in healthy persons. After periodontal therapy, antibody levels to *B. gingivalis*, *B. intermedius* and *A. actinomycetemcomitans* (serotype a) significantly decreased and the levels to

A. viscosus increased to a slight degree.

B. gingivalis was found more frequently in disease-active sites than in disease-inactive sites. The proportions of other bacterial species in disease-active sites did not differ from those in disease-inactive sites.

The results of the present investigation suggest that monitoring *B. gingivalis* in subgingival plaque and serum IgG antibody titer against this organism may aid in the description and adequate treatment of the periodontal disease.

Key words : Periodontopathic bacteria, Indirect fluorescent-antibody technique, Serum IgG titer, Disease activity, Re-evaluation

要旨 : 歯周病における診断指標を探索する目的で、歯周炎患者の初期治療前後における歯肉縁下プラーク中の6種類の歯周病原性細菌の検出とそれらに対する血清 IgG 抗体価の変動を調べた。臨床的に炎症程度が高いと判断された部位のプラーク中には *Bacteroides gingivalis* (Bg) が高い比率で存在していた。初診時に約80%の歯周ポケットから検出された Bg や *Bacteroides intermedius* (Bi) は、初期治療によって検出率および検出部位率が有意に減少した。そして、抗 Bg 抗体価および抗 Bi 抗体価は、初期治療後には初診時と比較して有意に減少した。さらに初期治療に対する臨床指数の改善度によって推定した疾病活性度と細菌検出率との関係を検討した結果、改善度の高い部位では低い部位よりも、初期治療後の Bg の検出率が有意に低かった。以上より、歯周治療に際してプラーク中の Bg の検出率と抗 Bg 抗体価が診断指標の一つとなる可能性が示唆された。

索引用語 : 歯周病原性細菌, 間接蛍光抗体法, 血清抗体価, 疾病活性度, 再評価

緒 言

微生物が感染すると、通常は、生体の免疫反応が作動し、その結果抗体が産生される¹⁾。感染症の解明には、感染病原体を検出し、同定することが第一義的に必要であるが、疾病が治癒あるいは慢性化しても、抗体産生や免疫反応が持続することがあり、何らかの形で症状の経過に関与すると考えられる。したがって、感染症の診断と治療に際して、病原微生物ならびにそれに対する宿主側の特異抗体の検出は、合理的な原因除去療法を施すうえで必要なことである。

歯周炎は歯肉縁下プラーク細菌によって惹起される炎症性疾患であり²⁻⁵⁾、宿主はこれらの細菌に対し種々の生体反応を起こしている。それゆえ、歯周炎においても、ポケット内細菌に基盤を置く治療体系が確立できれば、より効果的な歯周治療が行えると期待される。

近年、歯周病原性細菌としてグラム陰性嫌気性桿菌が注目されており⁶⁻¹⁰⁾、なかでも *Bacteroides gingivalis*¹¹⁻¹³⁾ および *Actinobacillus actinomycetemcomitans*¹⁴⁻¹⁶⁾ が、歯周病の病型と特異的に関連するという報告が数多くある。また、歯周炎の進行に伴う歯肉縁下細菌叢の変動や¹⁷⁻¹⁹⁾、歯周治療による歯肉縁下細菌叢の変動²⁰⁻²²⁾、さらに歯周病原性細菌に対する血清抗体価の変動と歯周治療との関連性^{23, 24)} についての研究などから、

歯周炎にある種の特定細菌が関連していることが示唆されている。しかしながら現在までのところ、これらの細菌が歯周炎を決定づける真の病原菌かどうかは確定されておらず、歯周治療における診断指標として利用し得るまでにはいたっていない。

病原性細菌の検査法は、次の2つに大別される。すなわち、患者より採取した検体から、顕微鏡的観察などにより直接細菌を検出する方法と、病巣から細菌を分離培養し、菌種の同定および感受性試験を行う方法である。塗抹染色標本の検鏡は従来から行われている細菌の迅速検査であり、現在でも場合によっては有用である。例えば、チールネルゼン染色法による喀痰の塗抹標本中の抗酸菌の証明は、抗結核剤使用開始の指標となる。しかし多くの場合、感染症の確定診断は原因菌の分離同定によって判断される。そして、これが不可能な場合、たとえば梅毒トレポネーマなどの培養不可能な菌については血中抗体価の測定が行われる。また、ASLO などによる連鎖球菌感染症、Widal 反応によるサルモネラ感染症の検査など、個々の感染症について多くの抗体価測定法が検討されている。一般には、抗原を換えるだけで同じ手法により特異抗体の測定が可能な方法として、補体結合反応、間接蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) などが挙げられる。

歯科領域において、暗視野あるいは位相差顕微鏡でプラークを直接観察する方法は、チェアーサイドで迅速に

行えるうえ、培養法では検出できないスピロヘータや運動性桿菌なども検出することができる。しかし、この方法は細菌をその形態と運動性によって分類できるだけで、菌種の同定は不可能である。一方、培養法を用いた検索によれば、分離された菌株の大部分が、その分類されるべき種属を決定できるが、場合によっては菌叢中に存在していた細菌のうち半分近くが発育してこなかったり、発育しても同定基準にあてはまらず、分類不能な菌が存在し、検索できる細菌は細菌叢の70%程度であるといわれている²⁵⁾。

歯肉縁下プラークを構成する細菌種の検索は、現在、主として培養法により行われているが、上記の問題点以外に、培養や同定に多くの時間と労力および経費が必要であるため、臨床の場ではより迅速かつ簡便な方法の開発が求められている。

本研究では間接蛍光抗体法により歯肉縁下プラーク中の特定細菌を直接検出する方法と、それらの特定細菌に対する患者末梢血中の特異抗体価をELISA法により測定する実験系を確立し、歯周初期治療前後の歯周炎患者の歯肉縁下プラークおよび血清を分析して、それらと種々の臨床指数との関係を統計的に解析する事により、歯周病における診断指標となり得る因子を検討した。

材料および方法

1. 被験者

大阪大学歯学部附属病院歯周病診療室を受診し、中等度以上の辺縁性歯周炎と診断され、全身的な異常を認めない52名(年齢21歳から53歳、平均38.9歳、男性23名、女性29名)を被験者とした。プロービングにより4mm以上の歯周ポケットの深さを示す128部位と、歯肉溝深さが3mm以下である20部位、合計148部位を被験部位として選択し、初診時に臨床所見を観察するとともに、歯肉縁下プラークの細菌学的検査と血清抗体価の測定を行った。その後、32名の患者の97部位については、刷掃指導、スケーリング、ルートプレーニング等を中心とした初期治療を施した後、再度、臨床所見の観察、歯肉縁下プラークの細菌学的検査および血清抗体価の測定を行った。なお、今回の被験者には、いわゆる典型的な限局型若年性歯周炎患者は含まれていない。

2. 臨床所見の観察

被験部位の病態を以下の臨床指数を測定することによって示した。

(1) プラーク指数(P1I): Silness と Le²⁶⁾ の基準

に従い、プラーク付着がみられないものを0、探針の擦過により薄膜状プラークが判明するものを1、中等度のプラーク付着が肉眼で観察されるものを2、歯面に多量のプラークが存在するものを3として評価した。

(2) 歯肉炎指数(GI): Le と Silness²⁷⁾ の基準に従い、健常歯肉を0、歯肉に軽度の炎症が存在するものを1、歯肉に中等度の炎症がみられ、歯周ポケットを探針で触れると出血するものを2、自然出血のみられる高度の炎症歯肉を3と評価した。

(3) ポケット深さ(PD): カラーコードプローブ(CP-12, Hu-Friedy, USA)を用いて約20gの測定圧で行い、1mm単位まで計測した。

(4) プロービング時の出血の有無(BP): PDを測定した後30秒以内に出血が認められたものを(+), 出血しなかったものを(-)とした。

(5) 骨吸収率(BLS): Schei ら²⁸⁾の方法により、骨吸収メジャーを用いて、デンタルX線写真上でセメント-エナメル境より歯槽骨頂までの距離の、歯根長に対する比率を求めた。

3. 試料の採取

1) 歯肉縁下プラークの採取

被験部位の歯肉縁上プラークを綿球で除去した後、ペーパーポイント(ジョンソン・エンド・ジョンソンKK, 東京)を歯肉溝底部まで挿入し、30秒間静置した。その後、ペーパーポイントを100μlの滅菌蒸留水中に浸漬し、vortex mixerにて10秒間攪拌して、プラーク浮遊液を作製した。

2) 血清の調製

被験者の肘正中静脈より静脈血5mlを採取して血清を分離した後、0.01%の濃度になるようにチメロサル(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA)を加え、測定に供するまで-20℃で保存した。なお、歯周炎非罹患者として、4mm以上の歯周ポケットが存在せず、口腔衛生管理の良好な者32名(20歳~39歳、平均28.7歳)の血清(健常者血清)を得て、患者血清と比較した。

4. 供試菌株とその培養

Actinomyces viscosus ATCC 19246, T 14 V および Nyl, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 および ATCC 29523, *Eikenella corrodens* 1073, 1080 および 375, *Fusobacterium nucleatum* 1436, 325, 364, 398, 1439 および 1440, *B. gingivalis* 381, ATCC 33277, H および 21, *Bacteroides intermedius* ATCC 33563 および ATCC 25611, *Bacteroides gracilis* 21, *Bacteroides ureolyticus* 32, *Streptococ-*

表 1 吸収操作を行った抗血清と細菌の組み合わせ

抗血清 細菌	抗 Av Bi	抗 Aa2 Aa3	抗 Aa3 Aa2	抗 Ec —	抗 Fn Bi	抗 Bg Bi	抗 Bi Ec
-----------	------------	--------------	--------------	-----------	------------	------------	------------

ウサギ抗血清 1ml に、凍結乾燥菌体 20 mg を加え、37℃ で 1 時間、続いて 4℃ で 12 時間吸収操作を行った。

cus sanguis ATCC 10556 は当講座保存の菌株を供試した。*Streptococcus mutans* MT 8148, OMZ 175, HS-1 および SE-11, *Streptococcus salivarius* HHT, HT 3 R および HT 9 R の各菌株は大嶋隆博士（大阪大学）から、*Streptococcus sanguis* 34 は鳥居光男博士（大阪大学）から、*A. actinomycetemcomitans* Y 4 および 301-b, *Bacteroides melaninogenicus* 7-70 および 7-92 の各菌株は加藤慶二郎博士（岡山大学、岡山）から、*E. corrodens* 211 L および 301 L は山崎洋治博士（ライオン第一応用研究所、小田原）から、*Haemophilus aphrophilus* ATCC 19415 および *Haemophilus influenzae* ATCC 9795 の各菌株は大阪大学微生物病研究所（大阪）から恵与された。

上記菌株の培養条件は以下のとおりである。すなわち、*Streptococcus* 属および *Actinomyces* 属の各菌株は、Brain Heart Infusion Broth（以下 BHI と略す、Difco Laboratories, Detroit, USA）にて、37℃ で、24 時間培養した。*Actinobacillus* 属の 4 菌株は、BHI で 37℃、24 時間、嫌氣的条件下（95% N₂, 5% CO₂）にて培養した。*Eikenella* 属の 5 菌株は、2 mg/ml の硝酸カリウム（和光純薬、大阪）と 5 μg/ml のヘミン（和光純薬）を含む Tryptic Soy Broth（以下 TS と略す、Difco Laboratories）で、*Fusobacterium* 属の 6 菌株は、0.5 μg/ml の L-システイン（和光純薬）を含む TS で、それぞれ 37℃、24 時間、嫌氣的に培養した。*Bacteroides* 属の各菌株は、5 μg/ml のヘミン（和光純薬）、0.5 μg/ml のメナジオン（和光純薬）を含む BHI（Difco Laboratories）で、37℃、48 時間、嫌氣的に培養した。*Haemophilus* 属の各菌株は、5 μg/ml のヘミン（和光純薬）を含む BHI（Difco Laboratories）で、37℃、24 時間培養した。

それぞれの培養終了後、7,000×g で 10 分間遠心して集菌し、得られた菌体を pH 7.2 の 10 mM リン酸塩緩衝生理食塩水（以下 PBS と略す）にて 3 回洗浄した後、以下の実験に用いた。

5. ウサギ抗血清の調製

ウサギ抗血清の作製は木村の記載²⁹⁾を参考にして行った。すなわち、歯周炎と関連が深いと目されている、*A. viscosus*（以下 Av と略す）から ATCC 19246 株を、*A. actinomycetemcomitans*（以下 Aa と略す）から ATCC

29522（Aa 2）株および ATCC 29523（Aa 3）株を、*E. corrodens*（以下 Ec と略す）から 1073 株を、*F. nucleatum*（以下 Fn と略す）から 1436 株を、*B. gingivalis*（以下 Bg と略す）から 381 株を、*B. intermedius*（以下 Bi と略す）から ATCC 33563 株を選択し（以下これらの細菌を特定細菌と称す）、それぞれの凍結乾燥菌体（6 mg）を滅菌生理食塩水（大塚製薬、東京）3 ml に浮遊させ、等量の Freund の完全アジュバンド（Difco Laboratories）と十分に混和した。得られたエマルジョンの計 2 ml を、体重約 3 kg のオスのニュージールランドラビット（静岡県実験動物農業共同組合、静岡）の背部皮下に、0.4 ml ずつ 5 カ所に分けて注射した。2 週間後、同様にして皮下に追加免疫を行い、さらに 2 週間後、ホルマリン処理した菌体を 1 mg/ml の濃度に滅菌生理食塩水に浮遊させた菌液 3 ml を静脈内にブースター注射した。初回免疫から 5 週間後に採血し、血清を分離してチメロサル（Sigma Chemical Co.）を 0.01% の濃度になるように添加した。

6. 抗血清の吸収

得られた抗血清を用いて間接蛍光抗体法によりそれぞれの特定細菌を染色した結果、抗 Aa 3 血清により Aa 2 が強く光った他、表 1 に示した組み合わせでごくわずかな蛍光を発したので、この交差性を示した菌株により抗血清を吸収した。吸収処理は Zambon ら³⁰⁾の記載をもとにして行った。すなわち、凍結乾燥菌体 20 mg をウサギ抗血清 1 ml に加え、37℃ で 1 時間振盪し、さらに 4℃ にて 12 時間静置した。そして、7,000×g の遠心により得られた上清を、各特定細菌に対する抗血清として、以下の実験に用いた。

7. 間接蛍光抗体法による特定細菌の検出系

スライドガラス上に、被験部位から採取した歯肉縁下プラーク浮遊液を 10 μl 滴下し、自然乾燥後、火焰固定した。そして、1% ウシ血清アルブミン（以下 BSA と略す、Sigma Chemical Co.）および 0.02% アジ化ナトリウム（和光純薬）を加えた PBS によって、500 倍に希釈したそれぞれの特定細菌に対するウサギ抗血清を 1 次抗体として滴下し、湿箱中にて 37℃ で 1 時間インキュベートした後、PBS にて 3 回洗浄した。つぎに、1% BSA と

0.02% アジ化ナトリウムを添加した PBS で 100 倍に希釈したフルオレッセインイソチオシアネート標識ヤギ抗ウサギ IgG (Cappel, Malvern, PA) を 2 次抗体として滴下し、1 次抗体の場合と同じ条件下でインキュベートした後、再度 PBS で 3 回洗浄し、0.1% パラフェニレンジアミン (和光純薬) および 10% トリス塩酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) を加えたグリセロールで封入した。このようにして得られた標本を蛍光顕微鏡 (MICROPHOT-FX, 日本光学工業 KK, 東京) を使用して観察し、蛍光物質による細菌の輪郭の明瞭性および形態を判断基準として、蛍光陽性細菌数を測定した。また、同一視野を位相差顕微鏡で観察することによって総菌数を求め、これに対する蛍光陽性細菌数の比率を算出して、特定細菌の検出率とした。

8. ELISA 法による血清 IgG 抗体価の測定

各特定細菌の凍結乾燥菌体を、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に浮遊させ、96 穴 ELISA 用マルチプレート (住友ベークライト, 東京) の各ウェルに 100 μl ずつ加え、4°C で一晩放置して抗原を吸着させた。そして、0.05% Tween-20 (和光純薬) 添加 PBS (以下 PBST と略す) にて 3 回洗浄後、PBST で 500 倍に希釈した被験者血清を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、37°C で 1 時間インキュベートした後、PBST で 3 回洗浄した。ついで、PBST にて 6,000 倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (TAGO, Inc., Burlingame, Ca., USA) を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え、37°C で 1 時間インキュベートした。3 回洗浄後、10% ジエタノールアミン (和光純薬) 緩衝液にパラニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム (和光純薬) を 1 mg/ml の割合で溶解した発色試薬を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加えた。そして、室温にて 30 分間インキュベートして発色させた後に、3 N NaOH を各ウェルに 50 μl ずつ加えて反応を停止させた。そして各ウェルの 405 nm における吸光度をコナマイクロプレート光度計 (MTP-32, コナ電気株式会社, 茨城) を用いて測定した。

ELISA UNIT は以下の方法で求めた。すなわち、予備実験にて比較的高い抗体価を示した血清を、標準血清として各特定細菌ごとに選択し、それぞれ $2^5 \sim 2^{15}$ まで段階希釈して吸光度を測定した。吸光度を縦軸、希釈倍率を横軸にとって得られた曲線を、4 変数 logistic 曲線を用いて回帰し、標準曲線を作製した。そして、標準血清を 512 倍に希釈したときの ELISA UNIT を 100 として、各被験血清の相対的抗体価を算出した。

9. 統計学的分析

初診時と初期治療後における PD、それぞれの特定細菌の検出率および血清抗体価の比較は、t 検定を用いて行い、P1I および GI の比較は Wilcoxon の検定にて比較した。BP (+) の部位数および特定細菌の検出部位数は、 χ^2 検定を用いて比較した。

被験部位を臨床所見により 2 群に分類し、それぞれの特定細菌検出率を t 検定により比較した。また、患者群と健常者群の血清抗体価も t 検定により比較した。

結 果

1. 間接蛍光抗体法による特定細菌検出系の特異性

今回調製したそれぞれの特定細菌に対する抗血清と種々の口腔内細菌との反応性を間接蛍光抗体法により検討した結果を表 2 に示した。抗 Av 血清により *A. naeslundii* ATCC 12104 が、また抗 Ec 血清により *B. ureolyticus* 32 が蛍光を発した他は、異なる菌種間で著明な交差反応は見られず、分類学的に Aa が属するであろうという報告^{31,32)}がある *Haemophilus* 属の 2 菌種も、抗 Aa 血清により、ごく微弱な蛍光を発した程度であった。したがって、この系が有する特異性は比較的高いことが示された。

同一菌種でも異なった菌株の間では各抗血清に対してどのような反応性を示すかを検討した結果、抗 Ec 血清、抗 Bg 血清および抗 Bi 血清は調べた各菌株に対して強い反応性を示した (表 2)。また、抗 Aa 2 血清は、免疫原である ATCC 29522 株と同じ血清型 b に属する Y4 株と強く反応し、逆に、抗 Aa 3 血清と Y4 株との反応性は低いものであった。抗 Av 血清はヒト由来の T14 V 株とは強く反応したが、ラット由来である Av の Ny1 株とは、低い反応性しか示さなかった。以上の抗血清は同じ菌種間に強い交差性を示したが、抗 Fn 血清は抗血清を作製した菌株以外の 5 株中 4 株と微陽性反応を示したにすぎず、調製した抗 Fn 血清による Fn の検出率は培養法による場合よりも低くなることが予測された。

2. 被験部位における初期治療前後の臨床所見

初期治療を行うことによって、P1I, GI, PD は初診時よりも有意に低下した (表 3)。また、初診時のプロービング時に出血がみられた部位は、初期治療後に有意にその数が減少し、全体として改善の傾向がみられた (表 3)。なお、BLS に初期治療が与える影響はわずかであると判断し、初期治療後の骨吸収率は測定しなかった。

表 2 特定細菌検出系による種々の口腔内細菌の反応性

菌 名	抗 血 清						
	抗 Av	抗 Aa2	抗 Aa3	抗 Ec	抗 Fn	抗 Bg	抗 Bi
<i>Streptococcus mutans</i> MT 8148	—	—	—	—	—	—	—
OMZ 175	—	—	—	—	—	—	—
HS-1	—	—	—	—	—	—	—
SE-11	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556	—	—	—	—	—	—	—
34	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus salivarius</i> HHT	—	—	—	—	—	—	—
HT 3 R	—	—	—	—	—	—	—
HT 9 R	—	—	—	—	—	—	—
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 19246	++	—	—	—	—	—	—
T 14 V	++	—	—	—	—	—	—
Ny 1	±	—	—	—	—	—	—
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104	+	—	—	—	—	—	—
<i>Actinobacillus</i>							
<i>actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522	—	++	—	—	—	—	—
ATCC 29523	—	—	++	—	—	—	—
Y 4	—	++	±	—	—	—	—
301-b	—	±	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus aphrophilus</i> ATCC 19415	—	±	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 9795	—	±	±	—	—	—	—
<i>Eikenella corrodens</i> 1073	—	—	—	++	—	—	—
1080	—	—	—	+	—	—	—
375	—	—	—	+	—	—	—
211 L	—	—	—	++	—	—	—
301 L	—	—	—	++	—	—	±
<i>Fusobacterium nucleatum</i> 1436	—	—	—	—	++	—	—
325	—	—	—	—	+	—	—
364	—	—	—	—	±	—	—
398	—	—	—	—	±	—	—
1439	—	—	—	—	±	—	—
1440	—	—	—	—	±	—	—
<i>Bacteroides gingivalis</i> 381	—	—	—	—	—	++	—
ATCC 33277	—	—	—	—	—	+	—
H	—	—	—	—	—	++	±
21	—	—	—	—	—	++	±
<i>Bacteroides intermedius</i> ATCC 33563	—	—	—	—	—	—	++
ATCC 25611	—	—	—	—	—	—	++
<i>Bacteroides gracilis</i> 21	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bacteroides ureolyticus</i> 32	—	—	—	+	—	—	—
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 7-70	—	—	—	—	—	—	±
7-92	—	—	—	—	—	—	±

—：蛍光がまったく観察されない

±：微弱な蛍光を発するが、菌の輪郭が不明瞭

+：菌の形態が明瞭に把握できる程度の蛍光を発する

++：+よりもさらに強い蛍光を発する

3. 特定細菌の検出率および検出部位率

初診時ならびに初期治療後のそれぞれの特定細菌の検出率を表4に、検出部位率を表5に示した。初診時の検出率は、最高がBgの3.50%であり、いずれも低い値であったが、検出部位率では被験部位の約80%からAv, Bg, Biが検出された。そして初期治療を行うことによって、BgおよびBiの検出率が有意に低下したが、Avは逆に上昇する傾向がみられた。また、検出部位率はAv以外の菌種において減少する傾向がみられ、特にFn, Bg, Biの3菌種において有意に低下した。Aa2は本研究の被験者からは、まったく検出されなかった。

4. 特定細菌に対する血清中のIgG抗体価

被験者のうち初期治療が終了した32名の患者群と32名の健常者群における、それぞれの特定細菌に対する血

清IgG抗体価を表6に示す。初診時における患者群の抗Bg抗体価は健常者よりも有意に高く、被験者全員が健常者の平均値を標準偏差の2倍以上越える高い値を示した。

一方、Avに対する患者群の抗体価は健常者よりも有意に低い値であった。患者の抗体価は、抗Av抗体価を除いて、初期治療によって減少する傾向にあり、なかでも

表4 特定細菌の検出率(%)

	初診時	初期治療後
Av	1.32±0.16 ^a	2.13±0.31
Aa2	0	0
Aa3	0.02±0.01	0.02±0.01
Ec	0.04±0.01	0.03±0.01
Fn	0.24±0.05	0.22±0.09
Bg	3.50±0.36	0.66±0.11*
Bi	1.26±0.17	0.63±0.16*

^a: 検出率の平均値±標準誤差

*: 初期治療後有意に減少(P<0.01: t検定)

表5 特定細菌の検出部位率

	初診時	初期治療後
Av	81/97 ^a	80/97
Aa2	0/97	0/97
Aa3	7/97	4/97
Ec	12/97	5/97
Fn	36/97	12/97*
Bg	84/97	48/97*
Bi	72/96	35/96*

^a: 検出部位数/被験部位数

*: 初期治療後有意に減少(P<0.01: χ^2 検定)

表3 被験部位の臨床所見

	初診時	初期治療後
P1I	1.1±0.1 ^a	0.6±0.1*
GI	1.3±0.1	0.7±0.1*
PD	6.6±0.2	4.7±0.2**
BP	81/97 ^b	33/97***
BLS	33.8±1.9	N.D.

^a: 平均値±標準誤差

^b: 出血部位/被験部位

N.D.: 測定せず

*: 初期治療後有意に減少

(P<0.01: Wilcoxon検定)

** : 初期治療後有意に減少

(P<0.01: t検定)

***: 初期治療後有意に減少

(P<0.01: χ^2 検定)

表6 特定細菌に対する血清中IgG抗体価(E.U.)

	健常者群 (n=32)	患者群 (n=32)	
		初診時	初期治療後
Av	194.9±41.9 ^a	98.9±13.6*	110.5±132.1
Aa2	340.0±61.7	431.4±88.7	353.8±135.1
Aa3	176.3±29.0	341.5±58.5	265.5±56.4**
Ec	163.7±31.1	160.7±20.0	148.2±17.8
Fn	89.2±9.7	76.3±10.9	75.8±9.7
Bg	26.7±4.8	994.6±166.8*	487.5±155.2***
Bi	95.6±14.8	93.5±12.1	71.8±8.9**

^a: 抗体価の平均値±標準誤差

*: 健常者の抗体価に対し有意差あり(P<0.01: t検定)

** : 初診時よりも初期治療後に有意に減少(P<0.05: t検定)

表 7 初診時のプラーク指数と特定細菌
検出率 (%)

	P1I=0 (n=26)	P1I=2 or 3 (n=45)
Av	0.79±0.20 ^a	1.53±0.29
Aa2	0	0
Aa3	0.02±0.01	0.03±0.02
Ec	0.08±0.06	0.03±0.01
Fn	0.30±0.10	0.32±0.10
Bg	3.15±0.82	3.03±0.46
Bi	1.50±0.54	1.37±0.25

^a : 検出率の平均値±標準誤差表 8 初診時の歯肉炎指数と特定細菌
検出率 (%)

	GI=0 (n=14)	GI=2 or 3 (n=49)
Av	0.97±0.25 ^a	0.99±0.55
Aa2	0	0
Aa3	0.01±0.01	0.03±0.02
Ec	0.08±0.05	0.03±0.01
Fn	0.16±0.07	0.15±0.07
Bg	1.18±0.65	3.57±0.59*
Bi	0.82±0.39	1.41±0.36

^a : 検出率の平均値±標準誤差

* : GI=0 の群に対し有意差あり (P<0.05 : t 検定)

表 9 初診時におけるプロービング時の出血の
有無と特定細菌検出率 (%)

	BP (-) (n=38)	BP (+) (n=110)
Av	1.31±0.20 ^a	1.43±0.20
Aa2	0	0
Aa3	0.03±0.01	0.02±0.01
Ec	0.09±0.03	0.04±0.02
Fn	0.11±0.05	0.28±0.05
Bg	1.07±0.35	3.20±0.35*
Bi	1.00±0.28	1.21±0.18

^a : 検出率の平均値±標準誤差

* : BP (-) の群に対し有意差あり (P<0.01 : t 検定)

Aa 3, Bg, Bi に対する抗体価は有意な低下がみられた。ただし、抗 Bg 抗体価は初期治療の後も、健常者よりもなお有意に高い値を示していた。

5. 初診時臨床所見と特定細菌検出率の関連性

52名の患者から選択した148被験部位から、初診時における臨床所見によって歯肉縁上プラーク量が多い群と少ない群、また炎症の程度が高い群と低い群を選出し、それぞれの特定細菌検出率を比較検討した。

表 10 初診時のポケット深さと特定細菌
検出率 (%)

	PD=2 or 3 mm (n=20)	PD≥7 mm (n=49)
Av	1.97±0.37 ^a	1.28±0.26
Aa2	0	0
Aa3	0.01±0.01	0.02±0.02
Ec	0.11±0.06	0.03±0.01
Fn	0.11±0.04	0.22±0.06
Bg	0.30±0.24	3.73±0.49*
Bi	0.63±0.30	1.39±0.25

^a : 検出率の平均値±標準誤差* : PD=2 or 3 mm の群に対し有意差あり
(P<0.01 : t 検定)

表 11 初診時の骨吸収率と特定細菌検出率 (%)

	BLS≤20% (n=44)	BLS≥50% (n=32)
Av	1.38±0.21 ^a	1.22±0.41
Aa2	0	0
Aa3	0.01±0.01	0.03±0.02
Ec	0.05±0.03	0.04±0.02
Fn	0.25±0.08	0.26±0.09
Bg	2.37±0.63	3.52±0.69
Bi	1.76±0.44	1.14±0.25

^a : 検出率の平均値±標準誤差

P1I が 0 の群と、2 または 3 の群における細菌検出率は、いずれの菌種についても両群間に有意差は認められなかった (表 7)。

GI が 0 の群と 2 または 3 の群、BP が (+) の群と (-) の群、PD が 2 mm または 3 mm と浅い群と 7 mm 以上の深い群に分類して、細菌検出率を比較した (表 8, 9, 10)。いずれの場合においても、臨床的に歯肉の炎症程度が強いあるいは歯周組織の破壊程度が大きいと判断される部位では、炎症が観察されないあるいは破壊の程度が小さい部位よりも、Bg が高い比率で検出された。Bg 以外の菌種の検出率に関しては、両群間に有意差はみられなかった。

骨吸収率が 20% 以下の群と 50% 以上の群における細菌検出率を比較すると、骨吸収率が大きい群では Bg の検出率が高い傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった (表 11)。Bg 以外の菌種の検出率も、両群間に有意差はみられなかった。

6. 初期治療による臨床指数の変動と特定細菌検出率との関係

初期治療が終了した 32 名の患者の 97 部位から、初期

表 12 プラーク指数の変動と初診時の特定細菌
検出率 (%)

	P1I 改善群 ^a (n=10)	P1I 非改善群 ^b (n=14)
Av	2.14±0.67 ^c	1.75±0.71
Aa2	0	0
Aa3	0.10±0.08	0.01±0.01
Ec	0.08±0.06	0.02±0.01
Fn	0.25±0.13	0.47±0.21
Bg	3.41±1.10	1.99±0.95
Bi	0.96±0.30	1.74±0.45

^a: 初期治療の前後で P1I が 2 以上減少した部位

^b: 初期治療の前後で P1I が変化しなかった
あるいは増加した部位

^c: 検出率の平均値±標準誤差

表 13 歯肉炎指数の変動と初診時の特定細菌
検出率 (%)

	GI 改善群 ^a (n=49)	GI 非改善群 ^b (n=12)
Av	1.66±0.27 ^c	0.94±0.28
Aa2	0	0
Aa3	0.03±0.02	0.02±0.02
Ec	0.09±0.04	0.01±0.01
Fn	0.30±0.08	0.09±0.06
Bg	4.80±0.79	2.55±0.70
Bi	1.49±0.37	1.38±0.51

^a: 初期治療の前後で GI が減少した部位

^b: 初期治療の前後で GI が変化しなかった
あるいは増加した部位

^c: 検出率の平均値±標準誤差

治療により臨床所見に改善が認められた群と認められなかった群を選出し、両群における細菌検出率の異同を検討した。分類方法を一括して述べると、P1I が 2 以上減少した P1I 改善群と変化なしまたは増加した P1I 非改善群 (表 12 および 16), GI が減少した GI 改善群と変化なしまたは増加した GI 非改善群 (表 13 および 17), 初診時の BP が (+) であったが初期治療後に BP が (-) となった BP 改善群と、初診時および初期治療後も BP が (+) であった部位と初診時には BP が (-) であったが初期治療後の BP は (+) であった部位を合わせた BP 非改善群 (表 14 および 18), PD が 3 mm 以上減少した PD 改善群と変化なしまたは増加した PD 非改善群 (表 15 および 19) である。

表 12~15 は、両群間で初診時の細菌検出率に違いがみられるか否かを検討したものであるが、いずれの場合にも検出率に有意差は無く、初期治療に対する歯周組織

表 14 プロービング時の出血の変動と初診時の
特定細菌検出率 (%)

	BP 改善群 ^a (n=50)	BP 非改善群 ^b (n=33)
Av	1.74±0.32 ^c	1.21±0.38
Aa2	0	0
Aa3	0.01±0.01	0.01±0.01
Ec	0.05±0.03	0.03±0.02
Fn	0.38±0.08	0.31±0.13
Bg	3.49±0.58	3.93±0.68
Bi	1.35±0.32	1.04±0.22

^a: 初診時 BP (+) が初期治療後 BP (-) になった部位

^b: 初診時 BP (+) あるいは BP (-) が初期治療後 BP (+) になった部位

^c: 検出率の平均値±標準誤差

表 15 ポケット深さの変動と初診時の特定細菌
検出率 (%)

	PD 改善群 ^a (n=18)	PD 非改善群 ^b (n=17)
Av	1.87±0.62 ^c	1.23±0.59
Aa2	0	0
Aa3	0.04±0.42	0.01±0.01
Ec	0.01±0.01	0
Fn	0.20±0.08	0.41±0.16
Bg	4.14±0.86	4.90±1.21
Bi	0.72±0.17	1.78±0.71

^a: 初期治療の前後で PD が 3mm 以上減少した部位

^b: 初期治療の前後で PD が変化しなかったあるいは増加した部位

^c: 検出率の平均値±標準誤差

表 16 プラーク指数の変動と初期治療後の特定
細菌検出率 (%)

	P1I 改善群 ^a (n=10)	P1I 非改善群 ^b (n=14)
Av	4.16±2.16 ^c	2.59±0.46
Aa2	0	0
Aa3	0	0.03±0.03
Ec	0	0.04±0.04
Fn	0	0.39±0.27
Bg	0.60±0.40	0.56±0.23
Bi	0.23±0.17	1.01±0.38

^a: 初期治療の前後で P1I が 2 以上減少した部位

^b: 初期治療の前後で P1I が変化しなかった
あるいは増加した部位

^c: 検出率の平均値±標準誤差

表 17 歯肉炎指数の変動と初期治療後の特定細菌検出率 (%)

	GI 改善群 ^a (n=49)	GI 非改善群 ^b (n=12)
Av	2.63±0.55 ^c	1.19±0.50
Aa2	0	0
Aa3	0.01±0.01	0.03±0.03
Ec	0.01±0.01	0.06±0.04
Fn	0.16±0.08	0
Bg	0.72±0.17	0.67±0.24
Bi	0.50±0.18	0.55±0.39

a: 初期治療の前後で GI が減少した部位

b: 初期治療の前後で GI が変化しなかった
あるいは増加した部位

c: 検出率の平均値±標準誤差

表 18 プロービング時の出血の変動と初期治療後の特定細菌検出率 (%)

	BP 改善群 ^a (n=50)	BP 非改善群 ^b (n=33)
Av	2.03±0.30 ^c	2.12±0.54
Aa2	0	0
Aa3	0	0.04±0.03
Ec	0.01±0.01	0.04±0.03
Fn	0.20±0.15	0.38±0.16
Bg	0.54±0.16	1.04±0.20*
Bi	0.39±0.15	0.91±0.30

a: 初診時 BP (+) が初期治療後 BP (-) になった
部位b: 初診時 BP (+) あるいは BP (-) が初期治療後
BP (+) になった部位

c: 検出率の平均値±標準誤差

*: BP 改善群に対し有意差あり (P<0.05: t 検定)

の反応性を初診時の細菌検出率によって予測することは
できなかった。

表 16~19 は、初期治療後の細菌検出率が両群間で異なるか否かを調べたものである。P1I または GI の改善度によって被験部位を 2 群に分けても、細菌検出率に有意差はみられなかった (表 16 および 17)。一方、BP または PD の改善度により 2 群に分類した場合、それぞれの非改善群では改善群よりも Bg が有意に多く存在していた (表 18 および 19)。

さらに、歯周病変をより総合的に評価する目的で、被験部位を、GI, BP, PD のうち初期治療により 2 つ以上の臨床指数が改善した群と、逆に 2 つ以上の指数が改善されなかった非改善群に分けて、それぞれの細菌検出率を比較した。初診時の細菌検出率を両群間で比較した結

表 19 ポケット深さの変動と初期治療後の特定細菌検出率 (%)

	PD 改善群 ^a (n=18)	PD 非改善群 ^b (n=17)
Av	3.26±1.37 ^c	0.95±0.27
Aa2	0	0
Aa3	0.02±0.02	0
Ec	0	0
Fn	0.04±0.03	0.07±0.07
Bg	0.21±0.09	1.17±0.35*
Bi	0.32±0.24	0.61±0.41

a: 初期治療の前後で PD が 3mm 以上減少した部位

b: 初期治療の前後で PD が変化しなかったあるいは
増加した部位

c: 検出率の平均値±標準誤差

*: PD 改善群に対し有意差あり (P<0.05: t 検定)

表 20 臨床指数の変動と初診時の特定細菌検出率 (%)

	改善群 ^a (n=36)	非改善群 ^b (n=13)
Av	1.75±0.34 ^c	0.66±0.18
Aa2	0	0
Aa3	0.03±0.02	0.01±0.01
Ec	0.08±0.04	0
Fn	0.30±0.08	0.11±0.10
Bg	3.79±0.71	3.45±0.64
Bi	1.50±0.42	1.06±0.40

a: GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善した部位

b: GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善
しなかった部位

c: 検出率の平均値±標準誤差

表 21 臨床指数の変動と初期治療後の特定細菌検出率 (%)

	改善群 ^a (n=36)	非改善群 ^b (n=13)
Av	2.85±0.71	1.52±0.59
Aa2	0	0
Aa3	0.01±0.01	0.06±0.06
Ec	0	0.05±0.05
Fn	0.06±0.04	0.07±0.07
Bg	0.33±0.12	0.98±0.36*
Bi	0.48±0.23	0.48±0.36

a: GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善した部位

b: GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善
しなかった部位

c: 検出率の平均値±標準誤差

*: 改善群に対し有意差あり (P<0.05: t 検定)

表 22 被験部位の改善と初診時の血清中
IgG 抗体価 (E.U.)

	被験部位がすべて 改善した患者群 ^a (n=4)	非改善部位を有する 患者群 ^b (n=11)
Av	53.9±28.9 ^c	115.6±35.6
Aa2	795.6±366.5	354.3±163.6
Aa3	613.9±171.7	863.9±470.3
Ec	162.1±33.7	190.2±43.6
Fn	74.5±7.6	48.9±10.5
Bg	1539.0±884.1	1018.0±323.2
Bi	69.9±23.0	83.9±23.1

^a: すべての被験部位において GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善した患者

^b: GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善しなかった部位を 1 つまたは 2 つ口腔内に有する患者

^c: 抗体価の平均値±標準誤差

果, いずれの特定細菌についても検出率に有意差は認められなかった (表 20)。一方, 初期治療後の細菌検出率を両群間で比較した場合, 非改善群では改善群よりも Bg の検出率が有意に高い値を示した (表 21)。

7. 初期治療による被験部位の改善性と血清抗体価との関係

表 20 および 21 に示したように, 97 被験部位の中で, 初期治療を行っても GI, BP, PD のうち 2 つ以上の臨床指数が改善しなかった部位は 13 部位であった。この非改善部位の各被験者における分布を調べると, 口腔内に 2 つの非改善部位を有した患者が 2 名, 1 つの非改善部位を有した患者が 9 名であった。残り 21 名の被験部位は, 改善群に分類されるかまたは臨床的に著明な改善はみられないものの, 非改善群には含まれないものであった。これに基づいて 32 名の被験者から, 口腔内に非改善部位を有する患者 11 名とすべての被験部位が改善した患者 4 名を選出し, それぞれの特定細菌に対する IgG 抗体価の差を検討した (表 22 および 23)。表 22 に初診時, 表 23 に初期治療後の IgG 抗体価を示したが, いずれの特定細菌に対する抗体価についても両群間に有意差はみられなかった。

考 察

間接蛍光抗体法は, 特定細菌を特異的に検出する臨床検査法として利用できることが示唆された (表 2)。すなわち, 本研究において異なる菌種間で, 比較的明確な交差反応を示したのは, 抗 Av 血清と *A. naeslundii*, お

表 23 被験部位の改善と初期治療後の血清中
IgG 抗体価 (E.U.)

	被験部位がすべて 改善した患者群 ^a (n=4)	非改善部位を有する 患者群 ^b (n=11)
Av	36.5±12.6 ^c	106.0±26.8
Aa2	315.2±138.0	553.5±454.6
Aa3	297.8±69.9	360.0±161.9
Ec	157.7±33.2	159.1±44.6
Fn	67.2±11.4	58.2±14.8
Bg	209.3±37.8	446.2±127.4
Bi	39.5±9.3	68.8±13.4

^a: すべての被験部位において GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善した患者

^b: GI, BP, PD のうち 2 つ以上の指数が改善しなかった部位を 1 つまたは 2 つ口腔内に有する患者

^c: 抗体価の平均値±標準誤差

よび抗 Ec 血清と *B. ureolyticus* の組み合わせだけであった。*B. ureolyticus* は以前に *Bacteroides corrodens* として Ec と共に同種の菌として分類されていた³³⁾が, このうち偏性嫌気性でウレアーゼ陽性の群を *B. ureolyticus* と命名した³⁴⁾のものであり, Ec との間に共通抗原を有していると推測される。

Bonta ら³⁵⁾は Aa の検出に, また Slots ら³⁶⁾は Aa と Bg の検出に, 間接蛍光抗体法および培養法の両者を比較検討した結果, 間接蛍光抗体法はこの 2 菌種の検出にあたって迅速かつ信頼できる方法であると報告している。間接蛍光抗体法によるプラーク中の特定細菌の検出は, 他菌種に対する交差反応の抑制と同一菌種内の異なった菌株を幅広く検出できるように今後一層の改良を加えることによって, 歯周ポケット内細菌に対する一次的な臨床検査法として広く用いられると思われる。

Moore ら³⁷⁾の分離培養法によると, *Actinomyces* 属は歯周炎患者から採取した歯肉縁下プラークの全分離菌中 10.5% を占めており, 健康者の歯肉溝プラークでは全分離菌の 35% に相当していたと報告している。本研究で用いた抗 Av 血清は, *A. naeslundii* と交差反応を示し, プラーク中に Av 以外の *Actinomyces* 属が存在していた場合, これらとも若干の交差性を示すものと推測される。本研究における Av の初診時検出率は 1.32% であり, 成人性歯周炎患者の歯肉縁下プラーク中における Av の検出率が約 3% であったという Loesche ら³⁸⁾の報告よりも低い値を示した。Moore らおよび Loesche らは, 歯肉縁下プラークの採取をスケーラーまたはキュレットを用いて行っており, この採取法は, 本研究のよう

にペーパーポイントを用いて歯肉縁下細菌叢を採取した場合と比較して、歯面付着性プラークの回収率が高くなると推測される。そして、Av は歯肉溝および歯周ポケット内において歯面付着性プラークを構成する細菌の一つである³⁹⁾ことをあわせて考察すると、キュレット法により歯肉縁下プラークを採取した場合には、同一ポケットに対してペーパーポイント法を用いる場合よりも Av の検出率が高くなると推測される。さらに、間接蛍光抗体法による特定細菌の検出率は、位相差顕微鏡下で観察される総ての細菌に対する特定細菌の割合であるため、培養できる細菌総数に対する特定細菌の割合として表現される培養法による検出率よりも、通常、低い数値であることも本研究において Av の検出率が低い値を示した理由と考えられる。

被験部位における Av の検出率と初診時の臨床指数との関連性を検討した結果、いずれも有意差はないものの P1I が大きい群および PD が浅い群では、それぞれ P1I が小さいおよび PD が深い場合よりも、Av の検出率が高い傾向を示した (表 7 および 10)。Av は歯肉縁上プラーク中に高い比率で存在すること^{40,41)}や、歯周治療後の患者より採取した歯肉縁下プラーク中に占める比率が未治療の歯周炎患者よりも高いこと⁴⁰⁾が報告されている。また、Av は *S. sanguis* とともに、プラーク形成のごく初期段階に関与すること⁴²⁾などを考慮に入れると、Av は歯周炎罹患部よりも歯肉炎において主要な病因的役割を果たす菌種であるのかもしれない。

本研究では、初期治療を行うことによって Av の検出率は 2.13% に上昇していた (表 4)。検出部位率においても、他の菌種は初期治療によって検出部位率が減少したのに対し、Av の検出部位率はほとんど変化しなかった。これらの結果は、通性嫌気性菌の占める比率が高く、偏性嫌気性菌およびスピロヘータの比率が低いことが歯周疾患と関連性を持たないプラークの特徴のひとつであるという Loesche ら^{38,43)}の結果と同じ傾向を示している。

歯周炎患者と健常者の間には抗 Av 抗体価に差が存在しなかったという報告^{44,45)}がある。また、Farida ら⁴⁶⁾の報告によると、歯周炎患者における Av に対する IgG 抗体価は、有意差はないものの健常者よりも低い傾向を示していた。一方、本研究では歯周炎患者の初診時における抗 Av 抗体価は健常者より有意に低かった (表 6)。これは、健常者の歯肉縁上および歯肉縁下プラーク中には歯周炎患者よりも多量の Av が存在する可能性を示唆するとも考えられるが、他方では次のような仮説も考え

られる。すなわち、歯面付着性歯肉縁下プラーク中に存在する Av が、健常者では接合上皮や歯肉溝上皮に近接しているため抗原刺激となるが、歯周炎患者の歯周ポケット内では多量に非付着性歯肉縁下プラークが存在するため Av がポケット上皮に接する機会が少なく、Av による抗原刺激作用が発動しにくいかもしれない。

初期治療後の血清抗体価の測定結果では、特定細菌の中で Av に対する抗体価のみが上昇していた (表 6)。初期治療によって Av の検出率は上昇したが、歯周ポケット内に存在する総菌数を測定することは非常に困難であるために、Av の菌数が増加していたかどうかは定かではない。実際には、初期治療により総菌数が減少しているために、Av の絶対数も減少していた可能性が考えられ、初期治療後にみられた抗 Av 抗体価の上昇が歯肉縁上および縁下プラーク中の Av 量の増加による結果であるとは断定できない。むしろ、初期治療の結果プラーク中において Av が他の特定細菌よりも高い比率を占めたことにより、Av が宿主に対して抗原刺激作用を加えたのではないかと推測される。本研究では行わなかったが、ペーパーポイントによって採取されたプラーク中の総菌数を測定することによって、歯周ポケット内の総菌数、さらに各特定細菌の絶対数ある程度予測することが今後の研究において必要であると考えられる。

Fn は、初診時において 97 部位中 36 部位から検出され、その平均検出率は 0.24% であった。この検出率は、Fn が歯周炎患者の病変部からの全分離菌 2,305 株中の 8.2% を占めたという Moore ら³⁷⁾の報告や、プラーク細菌中の約 4% を占めたという Loesche ら³⁸⁾の報告とは異なっている。Tanner ら¹⁷⁾は、*Fusobacterium* 属は歯周炎患者の歯肉縁下プラークから最も頻繁に分離同定されるが、本菌は形態学的ならびに生理学的に非常に多様であると述べている。また、ELISA 法を用いて IgG 抗体価を測定した Tolo ら⁴⁷⁾の報告によれば、2 株の Fn を含む 3 株の *Fusobacterium* 属に対する抗体価のうち、健常者より有意に高い値を示したのは 1 株だけであり、この結果は *Fusobacterium* 属について徹底した分類学的検討を加える必要性を示すものであると述べている。今回作製した Fn の 1436 株に対するウサギ抗血清と、1436 株以外の Fn の菌株との交差性を蛍光抗体法で確認した結果、Fn の 325 株のみが菌の形態が判断できる程度の蛍光を発したものの、他の株は全くの陰性ではないが、菌の輪郭が不明瞭であり陽性菌とは明らかに異なる蛍光発色を示した (表 2)。本研究で Fn の検出率が従来³⁷⁾の報告よりも低かった理由としては、Av の検出率の差に関

する考察と同じく、歯肉縁下プラークの採取方法による差および培養方法と間接蛍光抗体法による差に加えて、このFnが有すると考えられる株特異的な性質により、検出率に大きな差異が生じたものと思われる。したがって、今後の研究ではFn種に属する菌株を幅広く検出するために、これらの菌株に共通する菌体抗原を用いて抗血清を調製するか、あるいは数種類の菌株に対する抗血清を混合した抗血清標品を用いてプラーク細菌を検索する必要がある。

Mandellら^{48,49)}は、限局型若年性歯周炎患者のポケット内細菌を経時的に検討した結果、Ecは病変活性部位での検出率が病変不活性部位よりも有意に高いと報告しており、Tannerら⁵⁰⁾は、進行性歯周炎の病変活性部位および非活性部位におけるEcの平均検出率はそれぞれ2.4%と2.0%であり、多くの患者では活性部位の検出率が非活性部位よりも有意に高いが、非活性部位でも高い値を示す患者も存在したと述べている。しかしながら、本研究ではEcの検出率は非常に低く(表4)、特異抗体価は健常者と比較して有意差はなかった(表6)。また、炎症程度が高い部位と低い部位の間、初期治療により改善が認められた部位と認められなかった部位の間で、Ecの検出率に有意差はなかった。今回作製した抗Ec血清は、供試したEcのすべての株と反応性を示し、検出可能な菌株の範囲が広いことが示唆された。したがって、細菌の検出方法が異なることや、患者の年齢、病型が異なることが結果にこのような差が生じた理由と考えられるが、口腔内におけるEcの分布に人種間で差があるか否かの検索が必要であるかもしれない。

Aaが限局型若年性歯周炎の病因に関係していることを示唆する報告は多い。Slotsら¹⁴⁾は、正常な歯肉溝と比較して限局型若年性歯周炎患者の歯周ポケットからAaが多数検出されたと述べており、Zambonら⁵¹⁾も同様の結果を得ている。また、限局型若年性歯周炎患者の血清中には、Aaに対する抗体⁵²⁻⁵⁴⁾や、Aaが産生するleucotoxin^{55,56)}を中和する抗体^{57,58)}が存在することが報告されている。一方、限局型若年性歯周炎患者におけるAaの検出率がきわめて低かったという報告^{38,59)}もあり、Aaの限局型若年性歯周炎における役割についての完全な意見の一致は得られていない。

Zambonら^{30,51)}はAaをa, bおよびcの血清型に分類し、歯周炎患者および健常者の口腔内からは主にタイプaとbが分類され、中でも限局型若年性歯周炎患者からはタイプbが多く検出されたと述べている。この報告を参考にして、本研究ではAaのATCC 29522株(血清

型b)およびATCC 29523株(血清型a)に対する抗血清を用いて実験を行った結果、被験部位からタイプbは全く検出されず、タイプaの検出率も非常に低い値となった(表4)。一方、初診時における患者血清抗体価は、タイプaおよびb共に有意差はないものの健常者よりもやや高い傾向を示し、タイプaに対する抗体価は初期治療を行うことによって有意に減少した(表6)。

このように、本研究においてAaが歯周病変部局所からほとんど検出されなかったにもかかわらず、Aaに対しある程度の血清抗体価が検出された理由として、以下のことが推測される。すなわち、1)今回は、患者の総てのポケットから試料を得ていないため、Aaが存在する部位を逃した可能性、2)タイプcの菌が被験者の口腔内に存在しており、ELISA法によって、タイプcのAaが保有している、タイプaあるいはタイプbと共通した抗原に対する抗体を検出した可能性、3)分類学上Aaに近い他の菌種に対する抗体を検出した可能性、などが考えられる。

扇ら⁶⁰⁾の最近の報告によると、歯周炎に罹患している32部位から分離された157株のAaのうち、74株がタイプcで、10株がタイプa、そして残りの73株がいずれの血清型にも属さず、タイプbは全く検出されなかった。また、渡辺ら⁶¹⁾はAaの膜画分と可溶性画分を用いて歯周炎患者の血清IgG抗体価を測定した結果、20歳代の高度歯周炎患者においてタイプcに対する抗体価が高かったと報告している。本研究でAaの検出に用いた抗Aa2および抗Aa3血清は、免疫原とした菌株と異なるタイプのAaの菌株で吸収し特異性を高めた抗血清であるため、タイプcのAaを検出できなかったと推測される。一方、血清抗体価の測定にはそれぞれ抗原としたAaの菌株の全菌体を用いたので、タイプcとの共通抗原が存在し、タイプcに対する抗体を含めて検出した結果となったものと考えられる。今後、タイプcのAaに対する抗血清を用いて、歯周炎患者の歯肉縁下プラークを全顎的に検索し、口腔内に存在するAaと血清抗体価の上昇を示すAaの血清型が一致するか否かを検討する必要がある。

Pottら^{31,32)}は*H. aphrophilus*はAaと約35%のDNA相同性を示し、この両者が近い菌種であると報告している。Gencoら⁵³⁾は、*H. aphrophilus*および*H. influenzae*とAaに対する抗体価の相関性が低く、*Haemophilus*属の菌で吸収操作を行って抗Aa抗体価を測定しても、減少率は少ないと述べている。本研究では、結果の項には示していないが、抗Aa2血清を*S. sanguis*

で吸収すると、タイプ b に対する抗体価が OD 値で約 13% しか減少しなかったのに対し、*H. aphrophilus* で吸収した場合 41% 減少する結果を得た。したがって、本研究の被験者のプラーク中に *H. aphrophilus* が存在していたなら、Aa に対する IgG 抗体価になんらかの影響を与えると推測される。この問題点を解決する方法としては、Aa 特異抗原を精製して、これに対する血清抗体価を測定すること、あるいは Aa と共通した抗原を有すると判明している菌株を用いて、被験血清をあらかじめ吸収した後、抗 Aa 抗体価を測定することが考えられる。後者では、吸収に用いる細菌の口腔内における存在もあわせて検索しなければならないであろう。

黒色素産生性 *Bacteroides* である Bg と Bi の初診時における検出率は、それぞれ 3.5% および 1.26% であったが、初期治療後にはそれぞれ 0.66% および 0.63% と、いずれも有意に減少した (表 4)。また、初診時における臨床所見の違いによって被験部位を 2 群に分類し、それぞれにおける検出率を比較した結果、GI, BP および PD の各項目において、辺縁歯肉の炎症あるいは歯周組織破壊の程度が強い部位では、臨床的に炎症が軽度と判断された部位よりも Bg の検出率が有意に高い値を示した (表 8, 9 および 10)。骨吸収率でも同様の傾向がみられたものの、P1I すなわち歯肉縁上プラークの量が異なっても、Bg の検出率に差は認められなかった (表 7)。これは、歯周炎罹患部位では正常な歯肉溝と比較して黒色素産生性 *Bacteroides*、特に Bg が高頻度に検出されたという Spiegel ら⁶²⁾の報告や、PD および GI が高い値を示す部位には *Bacteroides* 属の細菌が高い比率で存在し、その中では Bg が優性であったという White ら¹¹⁾の結果と同じ傾向を示すものであった。

White ら¹¹⁾によると、ポケット深さが 6 mm 以上を示す部位での Bg の検出率は 27% であり、Spiegel ら⁶²⁾は、中等度の炎症を示す部位における Bg の検出率は 12.1% であったと報告している。これらの結果と本研究との間で Bg の検出率に大きな差が存在する理由として、対象とした被験者の病態がそれぞれの研究において異なっている可能性の他に、間接蛍光抗体法と培養法という検出方法の違いによるものと考えられる。しかしながら、検出率に差があるものの、歯周炎による組織破壊の程度が臨床的に高いと評価された部位では、低い部位と比較して Bg の検出率が有意に高かったことから、Bg は歯周病の診断に際して一つの指標となり得る細菌である可能性が示唆された。

斉藤ら⁶³⁾は、歯周病変部から分離された黒色素産生

性 *Bacteroides* のうち、Bi の検出率がきわめて高く、Bg の検出率は 1.1% と低かったと述べており、Zambon ら⁶⁴⁾も、成人性歯周炎患者から Bi が優勢な菌として検出されたと述べている。さらに、Bi と妊娠性歯周炎⁶⁵⁾、急性壊死性歯肉炎⁶⁶⁾との関連性が報告されており、Bi が歯肉の炎症を誘発できることが示唆されている。一方、Bi が健全な歯肉溝からも分離されること⁶²⁾や、歯周炎の進行に伴い Bg の検出率が高くなり、Bi の検出率は低下するという報告¹⁷⁾もあり、Bi と歯周炎との関連性は明確ではない。本研究では、Bg と Bi の初診時における検出部位率にほとんど差はみられなかったが、Bi の検出率は Bg の検出率よりも低かった。また、臨床指数によって被験部位を歯周炎の程度が強い群と弱い群に分類しても、それぞれにおける Bi の検出率に有意差はなかった。さらに、患者群と健常者群との間で抗 Bi 抗体価に有意差が認められなかったことは、Naito ら⁶⁷⁾の報告と一致する。これらの結果は、Bi が歯周炎患者に限らず歯周組織がある程度健康なヒトの口腔内にも広く分布することを示唆しているのかもしれない。

本研究で、Bg に対する患者血清抗体価が健常者よりも有意に高い値を示したことは、成人性歯周炎患者で抗 Bg 抗体価が上昇していたという他の報告^{12, 44, 67, 68)}と一致している。この抗 Bg 抗体価は、他報⁶⁸⁻⁷⁰⁾でも述べられているように、初期治療後に有意な低下を認めたが、依然として健常者の血清抗体価よりも高い値に留まっていた (表 6)。この抗 Bg 抗体価の変動は、歯肉縁下プラーク中における Bg の変動と関連性があるように思われる。すなわち、ポケット内の Bg 量が初期治療により減少したことにより、抗 Bg 抗体価が低下したものと考えられる。同様に、初期治療後における抗 Bi 抗体価の有意な減少も、Bi 量の減少を反映するものであろう。一般的に特異抗体は、抗原による刺激から約 1 ヶ月後に検出され、抗原が存在していれば抗体価は高い値を持続し、抗原を除去した後も抗体価の減少は緩慢である⁷¹⁾。患者群の初期治療後の抗 Bg 抗体価が健常者のものより有意に高かったのはこの機構のあらわれであろう。

初期治療による各種臨床指数の改善群と非改善群との間に、初診時の特定細菌の検出率に有意差は認められなかった (表 12~15)。つまり、初期治療により臨床指数が改善しなかった部位は、改善した部位よりも疾病活性度が高いと仮定し、この活性度を初診時の細菌検出率で予測しようとする試みは、本研究で用いた特定細菌では達成されなかった。一方、BP および PD 非改善群では、初期治療後の Bg の検出率が改善群よりも有意に高かつ

た(表 18 および 19)。さらに、複数の臨床指数が改善しなかった部位では、改善した部位と比較して、初期治療後も Bg が高い比率で存在していた。このような結果は、初期治療後の Bg の検出率が再評価後の歯周治療やメンテナンス期における処置方針を決定する際に指標の一つとなることを示唆しているのかもしれない。

Socransky ら⁷²⁻⁷⁴⁾は、歯周病は持続的に、また緩やかに進行していくのではなく、活動期と静止期を繰り返しながら進行していくものであり⁷⁵⁾、アタッチメントレベルを測定することによってこの活動期を探知した場合、従来から用いられている臨床指数はこの活動期を予知する指標とはならなかったと述べている⁷⁶⁾。本研究では、歯周初期治療に対する反応性に基づいて被験部位の疾病活性度を推定し、各特定細菌との関連性を検討した。すなわち、初期治療を行ったにもかかわらず炎症の程度が改善されない部位は、疾病活性度が高かったと仮定して実験を行った。この方法は、現在行われている歯周病の治療体系が、初めに原因因子の除去を基本とした初期治療を施した後、再評価を行って、各患者の確定的歯周治療へと進めていくため、歯周炎患者の治療を阻害することなく臨床研究を遂行できる利点がある。また、患者を長期間にわたり未治療のまま監視する必要がなく、直ちに治療体制に入れるという点で、他の研究者が歯周病患者者を未治療のまま病態の推移を測定していく際に苦慮している倫理的問題を考慮しなくてもよい。しかしながら、治療行為を伴った研究方法には、治療方法が同一であっても被験者および被験部位に対して同じ刺激を与えることにはならないという問題点がある。すなわち、1) 刷掃指導によって被験者が獲得した刷掃方法および能力に被験者間で差がある、2) ポケットの形態や、歯列不正などといった歯周組織の形態学的な差や、前歯部と臼歯部による違いが、被験部位に対する治療器具の到達度に差異を生じ、除去可能な歯肉縁下プラーク量が異なる、といった因子が治療効果を評価する際に影響を与えるであろう。また、歯周ポケット内の細菌を可及的に除去することは、当然のことながら歯肉縁下細菌叢に多大な影響を与え、治療効果として炎症状態の改善が大部分の被験部位でみられるため、Socransky らが述べるところの疾患の活動期、すなわち歯周炎が急速に進行する時期を捕らえにくいことも問題点の一つであろう。したがって、本研究での検定系を用いて、倫理的に許される期間内で未治療のまま、治療行為による因子を排除した条件下で疾病活性度を検討することも今後の課題の一つと考えられる。

一般に、常在菌などによって汚染されていない患者材料、たとえば血液、髄液などから検出された細菌は比較的容易に病原菌と断定することができる。しかし、歯周病のように多数の口腔内常在菌が存在する環境下での感染症の場合には、Socransky⁷⁷⁾ が示した判断基準、すなわち 1) 同じ微生物が疾病部位に高率にみられ、健全部位にはみられないか低率である、2) その微生物を排除すると疾病の進行が停止する、3) その微生物に対し宿主が特異的免疫応答を示す、4) 実験動物に類似の疾病を起こすことができる、5) 病原性を発揮する特殊な性質を有する、などに基づいて病原菌が推定される。本研究では、検討した特定細菌の中で、Bg がこれらの基準のうちの臨床分野における 1)~3) の条件をほぼ満たしていた。

初期治療により被験部位のすべてが臨床的に改善した患者群と、口腔内に 1 部位でも非改善部位を有した患者群の間に特定細菌に対する IgG 抗体価に違いがみられるか否かを検討した結果、いずれの特定細菌に対する抗体価に関しても有意差は認められなかった(表 22 および 23)。非改善部位が認められた患者の場合でも、同一口腔内の他の多くの部位は臨床的に改善しており、初期治療を行っても口腔内のほとんど総ての部位が非改善というような患者は本研究では認められなかったことがこの結果をもたらした理由の一つと考えられる。さらに、両群ともに抗 Aa 3、抗 Bg および抗 Bi 抗体価の初期治療による減少傾向が認められたことも、患者単位でみると被験者全員が初期治療に対して反応性を示したことを表していると考えられる。一般に、歯周炎は部位によって病変の程度やプラーク細菌叢が異なるため、患者の血清抗体価を単独で診断指標に用いた場合、部位特異性は表現しがたいであろう。しかしながら、本研究でみられた初期治療後における抗 Bg 抗体価の減少は、ポケット内の Bg が減少した結果生じたものと推察され、抗 Bg 抗体価と Bg の検出率との関連性が示唆された。このように歯周炎において、ある種の細菌に対する血清抗体価を測定することは、補助的な診断法として利用できるのかもしれない。

本研究により、歯肉縁下プラーク中における Bg の検出率が歯周炎の診断指標の一つとなり得る可能性が示唆された。また、実験方法に加えるべきいくつかの改良点が明らかとなった。今後、メンテナンス期の患者、あるいは未治療の患者のアタッチメントレベルを可能な期間内で経時的に測定し、治療行為による影響を与えずに歯周組織局所の疾病活性度を評価するといった多角度からの検討を考えている。そして、歯周ポケット内細菌の

検索に、総菌数の算出および暗視野顕微鏡によるスピロヘータや運動性桿菌の検出を加え、一方で歯周組織局所における生体の反応性、例えば歯肉溝浸出液中の炎症メディエーターの検索を行い、原因因子と生体反応の両面から歯周疾患を解析する事は興味深い研究方法と考えられる。

結 論

間接蛍光抗体法を用いた特定細菌検出系と、特定細菌に対する血清抗体価を ELISA 法によって測定する系を確立して、歯周炎患者の初期治療前後における歯肉縁下細菌叢の検索および血清中の特異 IgG 抗体価の測定を行い、これらと臨床指数との関連性を検討した結果、以下の所見を得た。

1. 間接蛍光抗体法によるポケット内細菌の定量法は比較的高い特異性を有し、臨床研究に際して有用な手段であることが示唆された。
2. 初診時の歯周ポケットから Av, Bg および Bi が高頻度に検出された。このうち、Bg および Bi は初期治療後に検出率および検出部位率が有意に減少したが、Av の検出率は増加する傾向にあった。
3. 初診時における患者血清中の抗 Bg 抗体価は、健康者よりも有意に高く、逆に抗 Av 抗体価は有意に低い値を示した。抗 Av 抗体価以外は初期治療によって減少し、特に Aa 3, Bg および Bi に対する抗体価は有意に減少した。しかし初期治療後の抗 Bg 抗体価は依然として健康者よりも有意に高い値を示した。
4. 初診時における GI, BP あるいは PD の値によって、歯周組織の炎症や破壊の程度が大きいと評価された部位には、その程度が小さいと評価された部位よりも Bg が有意に高い比率で存在していた。しかし、被験部位の P 1 I の大小によって細菌検出率の違いを検討しても、いずれの細菌についても有意差はなかった。
5. 被験部位を初期治療によって臨床所見が改善した部位と改善しなかった部位に分類して各特定細菌の検出率を比較した結果、BP 非改善群および PD 非改善群では、改善群よりも有意に高い比率で Bg が初期治療後のポケットに残存していた。一方、初期治療による治療効果の優劣は、初診時における各特定細菌の検出率で予測することはできなかった。
6. 被験部位を GI, BP および PD のうち初期治療により 2 つ以上改善した群と、2 つ以上非改善であった部位に分けて比較した場合、初診時の細菌検出率に有意差

は認められなかったが、非改善群の初期治療後の Bg 検出率は改善群よりも有意に高い値を示した。

以上の結果より、歯周治療に際して、歯肉縁下プラーク中の Bg の検出率と抗 Bg 抗体価が診断指標の一つとなり得る可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました口腔治療学講座岡田 宏教授に心から感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり直接御指導を頂きました口腔治療学講座恵比須繁之助教授に深く感謝いたしますとともに、適切な御助言を戴きました口腔治療学講座木村重信博士に深謝いたします。

最後に、本研究に対してさまざまな御援助と御協力を戴きました口腔治療学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Youmans, G.P. : Host-bacteria interactions : Immunologic internal defense mechanisms, *In* Youmans, G.P., Paterson, M.D. and Sommers, H.M. (ed.), The biologic and clinical basis of infectious diseases, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1985, 25-29.
- 2) Ellison, S.A. : Oral bacteria and periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 49 : 198-201, 1970.
- 3) Keyes, P.H. : Are periodontal pathoses caused by bacterial infections on cervicoradicular surfaces of teeth ? *J. Dent. Res.*, 49 : 223-228, 1970.
- 4) Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 49 : 203-222, 1970.
- 5) Kelstrup, J. and Theilade, E. : Microbes and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 1 : 15-35, 1974.
- 6) Slots, J. : Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand. J. Dent. Res.*, 85 : 247-254, 1977.
- 7) Slots, J. : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 85 : 114-121, 1977.
- 8) Slots, J. : The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 84 : 1-10, 1976.

- 9) Newman, M.G. and Socransky, S.S. : Predominant cultivable microbiota in periodontosis. J. Periodont. Res., 12 : 120-128, 1977.
- 10) Newman, M.G., Socransky, S.S., Savitt, E.D., Propas, D.A. and Crawford, A. : Studies of the microbiology of periodontosis. J. Periodontol., 47 : 373-379, 1976.
- 11) White, D. and Mayrand, D. : Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. J. Periodont. Res., 16 : 259-265, 1981.
- 12) Mouton, C., Hammond, P.G., Slots, J. and Genco, R.J. : Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus* (*Bacteroides gingivalis*) : relationship to age and periodontal disease. Infect. Immun., 31 : 182-192, 1981.
- 13) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J. and Frey, D.E. : Human immune responses to oral microorganisms : patterns of systemic antibody levels to *Bacteroides* species. Infect. Immun., 51 : 507-513, 1986.
- 14) Slots, J., Reynolds, H.S. and Genco, R.J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : a cross-sectional microbiological investigation. Infect. Immun., 29 : 1013-1020, 1980.
- 15) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J., Genco, R.J. and Frey, D.E. : Human immune responses to oral microorganisms I. Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Clin. exp. Immunol., 47 : 43-52, 1982.
- 16) Listgarten, M.A., Lai, C.-H. and Evian, C.I. : Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. J. Clin. Periodontol., 8 : 155-164, 1981.
- 17) Tanner, A.C.R., Haffer, C., Bratthall, G.T., Visconti, R.A. and Socransky, S.S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J. Clin. Periodontol., 6 : 278-307, 1979.
- 18) Lindhe, J., Liljenberg, B. and Listgarten, M. : Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. J. Periodontol., 51 : 264-269, 1980.
- 19) Evian, C.I., Rosenberg, E.S. and Listgarten, M.A. : Bacterial variability within diseased periodontal sites. J. Periodontol., 53 : 595-598, 1982.
- 20) Rosenberg, E.S., Evian, C.I. and Listgarten, M.A. : The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. J. Periodontol., 52 : 435-441, 1981.
- 21) Syed, S.A., Morrison, E.C. and Lang, N.P. : Effects of repeated scaling and root planing and/or controlled oral hygiene on the periodontal attachment level and pocket depths in beagle dogs II. Bacteriological findings. J. Periodont. Res., 17 : 219-225, 1982.
- 22) Singletary, M.M., Crawford, J.J. and Simpson, D.M. : Dark-field microscopic monitoring of subgingival bacteria during periodontal therapy. J. Periodontol., 53 : 671-681, 1982.
- 23) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J. and Haffajee, A.D. : Effect of subgingival scaling on systemic antibody responses to oral microorganisms. Infect. Immun., 48 : 534-539, 1985.
- 24) 岡村和則, 永井 淳, 熊澤 寛, 杉山雅昭, 水島 ゆみ, 光田由可, 高柴正悟, 栗原英見, 野村慶雄, 村山洋二 : 歯周病関連細菌に対する血清 IgG 抗体 第2報 歯周病治療に伴う血清 IgG 抗体の変動. 日歯周誌, 29 : 146-154, 1987.
- 25) Mandel, I.D. : Summary of conference and perspectives for the future, In Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. (ed.), Host-parasite interactions in periodontal disease, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1982, 404-409.
- 26) Silness, J. and Løe, H. : Periodontal disease in pregnancy II. correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odont. Scand., 22 : 121-135, 1964.
- 27) Løe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy I. prevalence and severity. Acta Odont. Scand., 21 : 533-551, 1963.

- 28) Schei, O., Waerhaug, J., Lovdal, A. and Arno, A. : Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol.*, 30 : 7-16, 1959.
- 29) 木村重信 : 多形核白血球による口腔放線菌食作用に関する研究—特に免疫血清のオプソニン効果と菌表層成分の関与—。 *阪大歯学誌*, 28 : 62-78, 1983.
- 30) Zambon, J.J., Slots, J. and Genco, R.J. : Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.*, 41 : 19-27, 1983.
- 31) Potts, T.V. and Berry, E.M. : Deoxyribonucleic acid-deoxy ribonucleic acid hybridization analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Int. J. Sys. Bact.*, 33 : 765-771, 1983.
- 32) Potts, T.V., Zambon, J.J. and Genco, R.J. : Reassignment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to the genus *Haemophilus* as *Haemophilus actinomycetemcomitans* comb. nov. *Int. J. Sys. Bact.*, 35 : 337-341, 1985.
- 33) Eiken, M. : Studies on an anaerobic, rod-shaped, Gram-negative microorganism : *Bacteroides corrodens* n. sp. *Acta Path. Microb. Scand.*, 43 : 404-416, 1958.
- 34) Jackson, F.L. and Goodman, Y.E. : *Bacteroides ureolyticus*, a new species to accommodate strains previously identified as "*Bacteroides corrodens*", anaerobic. *Int. J. Sys. Bact.*, 28 : 197-200, 1978.
- 35) Bonta, Y., Zambon, J.J., Genco, R.J. and Neiders, M.E. : Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque : Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Dent. Res.*, 64 : 793-798, 1985.
- 36) Slots, J., Hafström, C., Rosling, B. and Dahlen, G. : Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. *J. Periodont. Res.*, 20 : 613-620, 1985.
- 37) Moore, W.E.C., Ranney, R.R. and Holdman, L.V. : Subgingival microflora in periodontal disease : cultural studies, *In* Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. (ed.), *Host-parasite interaction in periodontal disease*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982, 13-26.
- 38) Loesche, W.J., Syed, S.A., Schmidt, E. and Morrison, E.C. : Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J. Periodontol.*, 56 : 447-456, 1985.
- 39) Newman, M.G. and Saglie, F.R. : The role of microorganisms in periodontal disease, *In* Carranza Jr., F.A. (ed.), *Glickman's clinical periodontology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1984, 361-390.
- 40) Loesche, W.J. and Syed, S.A. : Bacteriology of human experimental gingivitis : effect of Plaque and gingivitis score. *Infect. Immun.*, 21 : 830-839, 1978.
- 41) Syed, S.A. and Loesche, W.J. : Bacteriology of human experimental gingivitis : effect of plaque age. *Infect. Immun.*, 21 : 821-829, 1978.
- 42) Socransky, S.S., Manganiello, A.D., Propas, D. Oram, V. and van Houte, J. : Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J. Periodont. Res.*, 12 : 90-106, 1977.
- 43) Loesche, W.J. : Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci. Rev.*, 9 : 65-107, 1976.
- 44) 永井 淳, 岡村和則, 小林充治, 横山雅之, 熊澤寛, 杉山雅昭, 栗原英見, 野村慶雄, 村山洋二 : 歯周病関連細菌に対する血清 IgG 抗体 第1報 歯周病の病状と IgG 抗体との相関. *日歯周誌*, 29 : 132-145, 1987.
- 45) Doty, S.L., Lopatin, D.E., Syed, S.A. and Smith, F.N. : Humoral Immune response to oral microorganisms in periodontitis. *Infect. Immun.*, 37 : 499-505, 1982.
- 46) Farida, R., Marsh, P.D., Newman, H.N., Rule, D.C. and Ivanyi, L. : Serological investigation of various forms of inflammatory periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 21 : 365-374, 1986.
- 47) Tolo, K., Schenck, K. and Brndtzaeg, P. : Enzyme-linked immunosorbent assay for human IgG, IgA, and IgM antibodies to antigens from

- anaerobic cultures of seven oral bacteria. J. Immunol. Methods, 45 : 27-40, 1981.
- 48) Mandell, R. : A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. Infect. Immun., 45 : 778-780, 1984.
 - 49) Mandell, R.L., Ebersole, J.L. and Socransky, S.S. : Clinical immunological and microbiological features of active disease sites in juvenile periodontitis. J. clin. Periodontol., 14 : 534-540, 1987.
 - 50) Tanner, A.C.R., Dzink, J.L., Ebersole, J.L. and Socransky, S.S. : *Wolinella recta*, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis*, and *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. J. Periodont. Res., 22 : 327-330, 1987.
 - 51) Zambon, J.J., Christersson, L.A. and Slots, J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J. Periodontol., 54 : 707-711, 1983.
 - 52) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D. and Socransky, S.S. : Humoral immune responses and diagnosis of human periodontal disease. J. Periodont. Res., 17 : 478-480, 1982.
 - 53) Genco, R.J., Zambon, J.J. and Murray, P.A. : Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontal disease. J. Periodontol., 56 : 41-50, 1985.
 - 54) Vincent, J.W., Suzuki, J.B., Falkler Jr., W.A. and Cornett, W.C. : Reaction of human sera from juvenile periodontitis, rapidly progressive periodontitis, and adult periodontitis patients with selected periodontopathogens. J. Periodontol., 56 : 464-469, 1985.
 - 55) Hammond, B.F. and Stevens, R.H. : *Capnocytophaga* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : occurrence and pathogenic potential in juvenile periodontitis, In Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. (ed.), Host-parasite interaction in periodontal disease. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982, 46-61,
 - 56) Baehni, P., Tsai, C.-C., McArthur, W.P., Hammond, B.F. and Taichman, N.S. : Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived Gram-negative microorganism. Infect. Immun., 24 : 233-243, 1979.
 - 57) Tsai, C.-C., McArthur, P., Baehni, P.C., Evian, C., Genco, R.J. and Taichman, N.S. : Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol., 8 : 338-348, 1981.
 - 58) McArthur, W.P., Tsai, C.-C., Baehni, P.C., Genco, R.J. and Taichman, N.S. : Leukotoxic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Modulation by serum components. J. Periodont. Res., 16 : 159-170, 1981.
 - 59) Okuda, K., Naito, Y., Ohta, K., Fukumoto, Y., Kimura, Y., Ishikawa, I., Kinoshita, S. and Takazoe, I. : Bacteriological study of periodontal lesions in two sisters with juvenile periodontitis and their mother. Infect. Immun., 45 : 118-121, 1984.
 - 60) 扇 正一, 鴨井久一 : 歯周ポケットより分離された *Haemophilus actinomycetemcomitans* の血清学的検索. 日歯周誌, 30 : 秋季特別号 87, 1988.
 - 61) 渡辺幹一, 菅野寿一, 大橋正彦, 川浪雅光, 加藤 熙, 吉村文信, 鈴木 武 : 歯周疾患患者の体液性免疫応答に関する研究 1. 若年者歯周炎患者と *Actinobacillus actinomycetemcomitans* との関連について. 日歯周誌, 29 : 256-257, 1987.
 - 62) Spiegel, C.A., Hayduk, S.E., Minah, G.E. and Krywolak, G.N. : Black-pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal sites. J. Periodont. Res., 14 : 376-382, 1979.
 - 63) 斉藤 正 : 歯周疾患病巣における黒色色素産生 *Bacteroides* の検出率と分離菌種. 日歯周誌, 29 : 1-11, 1987.
 - 64) Zambon, J.J., Reynolds, H.S. and Slots, J. : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. Infect. Immun., 32 : 198-203, 1981.
 - 65) Kornman, K.S. and Loesche, W.J. : The sub-

- gingival microbial flora during pregnancy. J. Periodont. Res., 15 : 111-122, 1980.
- 66) Loesche, W.J., Syed, S.A., Laughon, B.E. and Stoll, J. : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol., 53 : 223-230, 1982.
- 67) Naito, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. : Immunoglobulin G response to subgingival Gram-negative bacteria in human subjects. Infect. Immun., 45 : 47-51, 1984.
- 68) 堀野一人 : *Bacteroides*, *Actinobacillus* に対する歯周疾患罹患者の血清及び歯肉溝滲出液抗体価について. 日歯周誌, 30 : 452-465, 1988.
- 69) 渡辺 久, 杉山栄一, 堀部元雄, 石川 烈 : 初期治療の歯周疾患関連菌に対する血清 IgG 抗体価に及ぼす影響について. 日歯周誌, 28 : 631-638, 1986.
- 70) Vincent, J.W., Falker, Jr., W.A., Cornett, W.C. and Suzuki, J.B. : Effect of periodontal therapy on specific antibody responses to suspected periodontopathogens. J. Clin. Periodontol., 14 : 412-417, 1987.
- 71) Chung, C.-P., Lee, Y.-K., Choi, S.-M. and Nisengard, R.J. : Antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Korean population. J. Periodontol., 57 : 510-515, 1986.
- 72) Haffajee, A.D., Socransky, S.S. and Goodson, J.M. : Periodontal disease activity. J. Periodont. Res., 17 : 521-522, 1982.
- 73) Goodson, J.M., Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D., Sornberger, G.C. and Socransky, S.S. : Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 9 : 472-481, 1982.
- 74) Haffajee, A.D., Socransky, S.S. and Goodson, J.M. : Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. J. Clin. Periodontol., 10 : 298-310, 1983.
- 75) Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M. and Lindhe, J. : New concepts of destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 11 : 21-32, 1984.
- 76) Haffajee, A.D., Socransky, S.S. and Goodson, J.M. : Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. J. Clin. Periodontol., 10 : 257-265, 1983.
- 77) Socransky, S.S. : Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 6 (no. 7 extra issue) : 16, 1979.